



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 199 12 706 A 1

61 Int. Cl.7:
C 07 K 14/31
C 07 H 21/04
A 61 K 39/085

21 Aktenzeichen: 199 12 706.9
22 Anmeldetag: 20. 3. 1999
43 Offenlegungstag: 7. 9. 2000

DE 199 12 706 A 1

66 Innere Priorität:
199 09 636. 8 05. 03. 1999

71 Anmelder:
Dr. Petry Genmedics GmbH, 72770 Reutlingen, DE

74 Vertreter:
Patentanwälte Ruff, Beier und Partner, 70173
Stuttgart

72 Erfinder:
Götz, Friedrich, Prof. Dr., 72076 Tübingen, DE;
Peschel, Andreas, Dr., 72076 Tübingen, DE

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:

DE 694 10 254
WO 98 57 994 A2

Chemical Abstracts:
Vol.130, 1999, Ref. 48165n;
Vol.124, 1996, Ref. 77888g;
Vol.123, 1995, Ref.277821w;
Vol.122, 1995, Ref.257698n;
Vol.131, Ref.16338;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

54 Wirkstoffe zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionserkrankungen

57 Die Gene, die für die am Einbau von D-Alanin in Teichonsäuren beteiligten Peptide/Proteine kodieren, wurden in *Staphylococcus xylosus* und *Staphylococcus aureus* identifiziert und sequenziert. Die Erfindung betrifft diese Sequenzen und die Ausnutzung der durch die Arbeiten mit diesen Sequenzen gewonnenen Ergebnisse für die Entwicklung von Wirkstoffen. Diese Wirkstoffe sind zur Behandlung von Krankheiten geeignet, die mit bakteriellen Infektionen im Zusammenhang stehen.

DE 199 12 706 A 1

Die Erfindung betrifft DNA-Sequenzen von Staphylokokken, die für Peptide/Proteine kodieren, die mit dem Einbau von D-Alanin in Teichonsäuren in Zusammenhang stehen. Weiterhin betrifft die Erfindung Wirkstoffe, die den Alanineinbau in Teichonsäuren beeinflussen können, und die für die Behandlung bakterieller Infektionserkrankungen geeignet sind.

Nosokomialinfektionen stellen im Krankenhausalltag ein schwerwiegendes Problem dar. Es handelt sich hierbei um Infektionen, die häufig durch banale Erreger verursacht werden, deren Übertragung gleichzeitig mit der Behandlung und Pflege erfolgt. Durch Infektionen mit diesen sog. Hospitalkeimen werden zahlreiche Todesfälle verursacht. Diese beruhen zum großen Teil auf den multiplen Antibiotikaresistenzen dieser Keime. Die klinischen Manifestationen von Nosokomialinfektionen sind sehr vielfältig. Neben Pilzen, Salmonellen, enteropathogenen Kolibakterien und Clostridien spielen Grampositive Bakterien, wie beispielsweise Staphylokokken oder Streptokokken, hierbei eine große Rolle. Ein Drittel bis die Hälfte aller Sepsisfälle werden durch Gram-positive Bakterien verursacht. Von den schon erwähnten Staphylokokken hat *Staphylococcus aureus* die größte pathogene und damit medizinische Bedeutung. *Staphylococcus aureus*-Stämme kommen bei Tieren und Menschen vor und sind beispielsweise die Erreger von abszedierenden Entzündungen sowie von Herzentzündungen und der schon erwähnten Sepsis.

Obwohl Gram-positive Bakterien bekanntermaßen keine Endotoxine, wie zum Beispiel LPS, bilden, sind sie trotzdem in der Lage, einen septischen Schock zu verursachen. Infolge der oft vorhandenen multiplen Antibiotikaresistenzen dieser Keime ist eine effektive Behandlung solcher Infektionen häufig nicht möglich.

Lipoteichonsäuren und Zellwandteichonsäuren, im folgenden als Teichonsäuren bezeichnet, sind neben dem Peptidoglykan Hauptbestandteile der Zellwand von Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt (Staphylokokken, Streptokokken, Bazillen, etc.). Die Teichonsäuren können 40–60% der Zellwand von Gram-positiven Bakterien ausmachen. Es handelt sich hierbei um Kettenmoleküle mit polymerer Phosphodiester-Struktur. Die Phosphodiester-Gruppen sind durch Glycerin oder Ribit miteinander verbunden. An einem Ende des polymeren Moleküls befindet sich eine Oligosaccharid-Verbindungseinheit, die im Fall der Lipoteichonsäuren wiederum einen Diacylglycerin-Rest trägt. Die Teichonsäuren sind mit D-Alanin und verschiedenen Zuckern substituiert. Lipoteichonsäuren sind über ihre Glycolipid-Struktur (Oligosaccharid + Diacylglycerin) in der Zellmembran der Bakterien verankert. Die Zellwandteichonsäuren sind kovalent mit dem Peptidoglykan verknüpft. Zur Verdeutlichung der Struktur der Teichonsäuren wird auf **Fig. 1** verwiesen.

Die Funktionen der Teichonsäuren sind bisher noch nicht vollständig verstanden. Es ist jedoch davon auszugehen, daß sie für die Bakterien lebenswichtig sind. Es wurde ein Einfluß von Teichonsäuren auf die Aktivität von autolytischen Enzymen und auf die Zellmorphologie beschrieben, was auf eine Rolle bei der Zellteilung hinweist. Zudem wird eine Kontrolle der Mg^{2+} -Konzentration in der Zellwand durch Teichonsäuren diskutiert. Weiterhin ist bekannt, daß Teichonsäuren eine Endotoxin-ähnliche Aktivität besitzen und eine Rolle bei Staphylokokkeninfektionen spielen können (Kengatharan, K.M., S.De Kimpe, C. Robson, S.J. Foster, and C. Thiemeermann. 1998. Mechanism of Gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase,

shock, and multiple organ failure. J. Exp.Med. 188: 305–315).

Aufgrund des Hinweises, daß Teichonsäuren eine essentielle Rolle für die Bakterienzelle spielen, wurden bereits Versuche unternommen, die Biosynthese der Teichonsäuren als möglichen Zielpunkt für die Suche nach neuen Wirkstoffen gegen Staphylokokken auszunutzen. Die Anstrengungen in dieser Richtung haben bisher noch nicht zu einem Erfolg geführt (W. Fischer, Spektrum, Sonderband 1997, 47–50).

Nach dem bisherigen Wissensstand sind die Enzyme, die für die D-Alanin-Substitution der Teichonsäuren verantwortlich sind, nicht essentiell für die Bakterienzelle (Wecke, J., Perego, M. und Fischer, W. (1996) Microbial Drug Resistance, Vol. 2 on "Mechanism, epidemiology and disease" 123–129). Diese Enzyme wurden deshalb bisher nicht als interessante Zielpunkte für die Wirkstoffentwicklung gegen Gram-positive Bakterien angesehen.

Da bis zum heutigen Zeitpunkt die Notwendigkeit besteht, neue effektive Wirkstoffe für die Behandlung von Krankheiten, die mit bakteriellen Infektionen in Zusammenhang stehen, insbesondere mit Infektionen, bei denen Gram-positive Bakterien eine Rolle spielen, zu entwickeln, stellt sich die Erfindung die Aufgabe, neue Strategien zum Auffinden effektiver Wirkstoffe zu erarbeiten und auf dieser Basis die entsprechenden Wirkstoffe zur Verfügung zu stellen. Die neuen Strategien basieren auf den Ergebnissen, die durch die Bereitstellung der in den Ansprüchen 1 bis 7 beanspruchten DNA-Sequenzen gewonnen wurden. Die von diesen DNA-Sequenzen abgeleiteten Genprodukte bzw. Aminosäure-Sequenzen sind in den Ansprüchen 8 und 10 beansprucht. Ein Vektor, der entsprechende DNA-Sequenzen enthält, ist in den Ansprüchen 11 bis 14 beschrieben. Die Ansprüche 15 bis 17 betreffen Organismen, die durch molekularbiologische Arbeiten mit den beanspruchten DNA-Sequenzen zu gewinnen sind. Anspruch 18 betrifft Teichonsäuren, die insbesondere von diesen Organismen gebildet werden können. Ansprüche 19 bis 26 beschreiben erfindungsgemäße Wirkstoffe. Die Ansprüche 27 und 28 beziehen sich auf die Verwendung dieser Wirkstoffe bzw. auf pharmazeutische Zusammensetzungen zur Behandlung von bakteriellen Infektionskrankheiten und deren Verwendung. Die Verfahren zum Auffinden der erfindungsgemäßen Wirkstoffe sind in den Ansprüchen 29 bis 32 dargestellt. Der Wortlaut sämtlicher Ansprüche wird hiermit durch Bezugnahme zum Inhalt der Beschreibung gemacht.

Die Erfindung umfaßt das überraschende Ergebnis, daß bei Gram-positiven Bakterien der Alanineinbau in Teichonsäuren mit der Sensitivität dieser Bakterien gegenüber antimikrobiellen Substanzen im Zusammenhang steht. Die Substitution der Teichonsäuren mit Alanin bedingt offensichtlich die Resistenz der Bakterien gegen solche Substanzen. Dies bedeutet, daß durch eine Hemmung des Alanineinbaus die Bakterien empfindlicher gegenüber antimikrobiellen Substanzen werden, und auf diese Weise angreifbar sind. Dieses Ergebnis eröffnet einen völlig neuen Aspekt für eine Wirkstofffindung, indem der Alanineinbau in Teichonsäuren als Angriffspunkt für die zu entwickelnden Wirkstoffe gewählt wird.

Im Gegensatz zu den hochspezifischen Resistenzsystemen der Antibiotika scheinen die D-Alanineester mit einem generellen Resistenzmechanismus gegen kationische Peptide im Zusammenhang zu stehen. Die D-Alanineester, die sich bei vielen anderen pathogenen Bakterien, wie Streptokokken, Enterokokken und Listerien finden, spielen somit eine wichtige Rolle bei der Resistenz dieser Krankheitserreger gegenüber den Komponenten der natürlichen Immunität.

Die Gene, die für Peptide/Proteine kodieren, die am Ein-

bau von D-Alanin in Teichonsäuren beteiligt sind, wurden in *Staphylococcus xylosus* C2a und *Staphylococcus aureus* Sa113 identifiziert und sequenziert (**Fig. 2** und **Fig. 3**). Die DNA-Sequenzen besitzen in beiden Organismen die gleiche Anordnung und liegen in einer Operon-ähnlichen Struktur mit nachfolgendem Transkriptionsterminator vor. Die Struktur dieses sog. *dltABCD*-Operons geht aus der **Fig. 4**, oberer Teil, hervor. Von den entsprechenden Sequenzen werden vier Peptide/Proteine kodiert, nämlich *DltA*, *DltB*, *DltC*, *DltD*. Ein weiteres offenes Leseraster (orf 1) am 5'-Ende der Sequenz weist Ähnlichkeiten zu Hydroxysäure-Dehydrogenasen auf. *DltA* ist eine D-Alanin-D-Alanyl-Carrierproteinligase. *DltB* ist wohl ein Membranprotein, welches gleichfalls am D-Alanineinbau in Teichonsäuren beteiligt ist. *DltC* ist ein D-Alanin-Carrierprotein und *DltD* ist wohl ein Exoprotein, welches ebenfalls am D-Alanineinbau in Teichonsäuren beteiligt ist (**Fig. 5** und **6**).

Mit der Identifizierung und Charakterisierung der *dlt*-Gene aus *Staphylococcus xylosus* und *Staphylococcus aureus* lassen sich auch die entsprechenden homologen Gene aus anderen *Staphylokokken*-Arten und verwandten Arten identifizieren.

Neben den DNA-Sequenzen dieser *dltABCD*-Operons, einschließlich deren Fragmente, aus *Staphylococcus xylosus* und *Staphylococcus aureus* umfaßt die Erfindung DNA-Sequenzen, die mit diesen Sequenzen hybridisieren.

Weiterhin umfaßt die Erfindung DNA-Sequenzen der *dltABCD*-Operons, die mindestens eine Mutation tragen. Beispiele für solche Mutationen sind Insertionen oder Deletionen. Durch Transposoninsertionen und homologe Rekombination unter Verwendung von gängigen molekularbiologischen Methoden wurde die Bedeutung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen für den Einbau von D-Alanin in Teichonsäuren und die Bedeutung dieses D-Alanineinbaus für die Bakterien untersucht, wie aus den Beispielen zu entnehmen ist. Die Mutationsstrategien, die beispielhaft durchgeführt wurden, gehen aus **Fig. 4** hervor.

Die Erfindung umfaßt neben den DNA-Sequenzen Vektoren für beispielsweise molekularbiologisches Arbeiten, die diese Sequenzen oder Teile davon tragen. Insbesondere sind hiermit Vektoren gemeint, die eine entsprechende DNA-Sequenz in veränderter Form aufweisen, wobei beispielsweise durch eine Insertion oder eine Deletion die Expression eines funktionsfähigen Peptids/Proteins verhindert ist. Die Expression der Peptide/Proteine kann auch durch einen Eingriff in die regulatorischen Elemente der Sequenz, bevorzugt durch eine Inaktivierung entsprechender Promotorsequenzen, beeinflußt werden. Durch den Einsatz dieser erfindungsgemäßen Vektoren kann die Funktionsweise der verschiedenen, in dem *dltABCD*-Operon kodierten Proteine/Peptide untersucht und gezielt beeinflußt werden.

Weiterhin werden Organismen von der Erfindung umfaßt, wobei es sich hier insbesondere um bakterielle Mikroorganismen, wie beispielsweise Gram-positive Bakterien, handelt, die bzgl. der am D-Alanineinbau beteiligten Peptide/Proteine verändert sind. Hierbei kann es sich beispielsweise darum handeln, daß eines dieser Peptide/Proteine in besonders starkem Maße gebildet wird. Es ist auch möglich, die Bildung eines Peptids/Proteins gezielt zu vermindern oder vollständig zu unterbinden. Die veränderten Expressionsraten der entsprechenden Peptide/Proteine können insbesondere dadurch erreicht werden, daß die relevanten Gene inaktiviert werden, in ihrer Kopienanzahl verändert werden oder daß die Transkriptions- oder Translationssignale verändert werden.

Die Erfindung bezieht sich auch auf die Teichonsäuren bzw. deren Vorläufermoleküle, die von diesen veränderten Organismen gebildet werden, wobei sich diese Teichonsäu-

ren erfindungsgemäß durch ihren D-Alaniningehalt von natürlich vorkommenden Teichonsäuren unterscheiden. Solche entsprechend veränderten Teichonsäuren können auch durch in vitro-Methoden hergestellt werden.

Ein erfindungsgemäßer Wirkstoff ist dadurch gekennzeichnet, daß er eine mit Teichonsäuren im Zusammenhang stehende Wirkung, beispielsweise im menschlichen Körper, beeinflußt, wobei eine Verminderung einer unerwünschten Wirkung bevorzugt ist. Teichonsäuren als Bestandteile der Zellwand/Zellmembran von Gram-positiven Bakterien können auf menschliche oder tierische Zellen eine entzündungsfördernde, also inflammatorische, Wirkung ausüben. Diese für den Körper in der Regel schädliche Wirkung wird durch den erfindungsgemäßen Wirkstoff vermindert oder ausgeschaltet.

Der erfindungsgemäße Wirkstoff setzt vorzugsweise bei Peptiden/Proteinen an, welche am Einbau von D-Alanin in Teichonsäuren von Gram-positiven Bakterien beteiligt sind. Die Verwendung eines solchen Wirkstoffes führt demgemäß dazu, daß der Einbau von D-Alanin in die Teichonsäuren der Bakterien beeinflußt wird, wobei eine Verminderung des D-Alanin gehaltes der Teichonsäuren bevorzugt ist.

Die Verwendung eines erfindungsgemäßen Wirkstoffes führt dazu, daß die Mikroorganismen, die bekämpft werden sollen, eine Empfindlichkeit oder eine höhere Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Substanzen entwickeln. Bei den zu bekämpfenden Mikroorganismen handelt es sich insbesondere um Gram-positive Bakterien, wie beispielsweise *Staphylokokken*, *Streptokokken*, *Bazillen*, etc.

Die antimikrobiellen Substanzen, gegen welche die Bakterien nach Behandlung mit den erfindungsgemäßen Wirkstoffen eine ggf. erhöhte Empfindlichkeit zeigen, können unterschiedlichen Ursprungs sein. Es kann sich dabei um kationische antimikrobielle Peptide aus menschlichen oder tierischen Zellen handeln, wie zum Beispiel die Host defense-Peptide aus Leukozyten (Defensine, Protegrine o. ä.). Weiterhin kann es sich auch um bakterielle Substanzen wie Lantibiotika handeln. Vertreter hiervon sind beispielsweise Gallidermin oder Nisin.

Nach der Behandlung mit den erfindungsgemäßen Wirkstoffen können die Gram-positiven Bakterien durch die antimikrobiellen Substanzen ausgemerzt werden. Ohne diese entsprechende Behandlung sind die Bakterien gegenüber diesen Substanzen resistent. Die antimikrobiellen Substanzen können ohne eine Applikation von außen im Körper vorhanden sein, wie zum Beispiel die Host defense-Peptide aus Leukozyten. Auch die bakteriellen Lantibiotika können im Körper bei Vorhandensein entsprechender Bakterien gebildet werden. Andererseits ist es auch möglich, solche antimikrobiellen Peptide einem zu behandelnden Patienten zuzuführen.

Ein erfindungsgemäßer Wirkstoff kann sich alternativ oder zusätzlich dadurch auszeichnen, daß er die Biofilmbildung von Mikroorganismen verringert oder verhindert. Beispielsweise sind *Staphylococcus aureus* und auch andere *Staphylokokkus*-Arten in der Lage, sich auf implantierten Plastikmaterialien, wie Kathetern, Herzklappen, Herzschrittmachern usw. als ein sog. Biofilm anzusiedeln, was zu folgenschweren Infektionen bis hin zur lebensbedrohlichen Sepsis führen kann. Diese sehr unerwünschte Biofilmbildung von Mikroorganismen, insbesondere von *Staphylokokkus*-Arten, kann durch die Erfindung, insbesondere durch den Einsatz des erfindungsgemäßen Wirkstoffes verringert oder sogar vollständig unterbunden werden.

Bei dem erfindungsgemäßen Wirkstoff handelt es sich vorzugsweise um ein Peptid oder ein Protein. Es können auch Stoffe aus beispielsweise Naturstoffbibliotheken oder aus kombinatorischen Bibliotheken eingesetzt werden.

Erfindungsgemäß werden die oben beschriebenen Wirkstoffe für die Behandlung von Krankheiten verwendet, die mit bakteriellen Infektionen in Zusammenhang stehen. Einen Schwerpunkt dieser Infektionen bilden die sog. Nosokomialinfektionen, die beispielsweise in Krankenhäusern oft auftreten. Weiterhin kommt eine Verwendung dieser Wirkstoffe bei der Implantation von Plastikmaterialien in Frage, da wie oben beschrieben die Biofilmbildung auf solchen Materialien durch die erfindungsgemäßen Wirkstoffe vermindert wird.

Die Erfindung umfaßt weiterhin pharmazeutische Zusammensetzungen, die entsprechende Wirkstoffe enthalten sowie die Verwendung eines Wirkstoffs mit mindestens einem der oben aufgeführten Merkmale zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung. Diese pharmazeutischen Zusammensetzungen sind insbesondere für die Behandlung von Krankheiten einzusetzen, die mit bakteriellen Infektionen in Zusammenhang stehen.

Zusätzlich wird von der Erfindung ein Verfahren zur Behandlung von bakteriellen Infektionen und zur Behandlung von unerwünschter Biofilmbildung auf implantierten Materialien umfaßt, wobei die erfindungsgemäßen Wirkstoffe verabreicht werden.

Verschiedene erfindungsgemäße Verfahren können zur Suche eines Wirkstoffes eingesetzt werden, welcher mindestens eines der oben beschriebenen Merkmale aufweist. Hierbei kann die Empfindlichkeit/Sensitivität der zu bekämpfenden Mikroorganismen gegenüber antimikrobiellen Substanzen als Maß für die Wirkung eines potentiellen Wirkstoffes herangezogen werden. Bei entsprechenden Verfahren wird der zu bekämpfende Mikroorganismus, beispielsweise Gram-positive Bakterien, mit einer Substanz behandelt, die antimikrobiell wirkt. Normalerweise würde der Mikroorganismus gegen eine solche Substanz resistent sein. Doch durch eine Inkubation mit einem potentiellen Wirkstoff wird die Sensitivität des Mikroorganismus gegenüber der antimikrobiellen Substanz erhöht, vorausgesetzt, daß der Wirkstoff effektiv ist. Diese erhöhte Sensitivität kann durch erniedrigte Wachstums- und/oder Überlebensraten der zu bekämpfenden Mikroorganismen nachgewiesen werden.

Ein weiteres Verfahren zur Suche eines effektiven Wirkstoffes gegen insbesondere Gram-positive Bakterien nutzt die verringerte Biofilmbildung an Oberflächen, insbesondere an Kunststoff- oder Glasoberflächen, als Maß für die Wirkung des potentiellen Wirkstoffs. Hierfür werden die zu bekämpfenden Mikroorganismen mit einem potentiellen Wirkstoff behandelt und anschließend die Biofilmbildung in Form einer Bestimmung von schleimbildenden Substanzen, beispielsweise dem "polysaccharid intercellular adhesin", von Schleimsubstanz allgemein oder durch Bestimmung der Anzahl von adhärenierenden Mikroorganismen analysiert. Der Nachweis der Bakterien, der Schleimsubstanz oder der schleimbildenden Substanzen kann mit Farbstoffen, Fluoreszenzgruppen, radioaktiven Isotopen oder spezifischen Antisera erfolgen.

Vorteilhaft ist auch die Bestimmung der Bindungsfähigkeit von Teichonsäuren an Oberflächen bei Zugabe von zu testenden, potentiellen Wirkstoffen. Der Nachweis kann durch Markierung der Teichonsäuren mit radioaktiven Isotopen, Farbstoffen oder Fluoreszenzgruppen erfolgen oder mit spezifischen Antisera durchgeführt werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Suche eines Wirkstoffes besteht in der Analyse der inflammatorischen Wirkung der zu bekämpfenden Mikroorganismen. Für diese Untersuchungen können auch die Teichonsäuren herangezogen werden, die durch die Behandlung mit einem potentiellen Wirkstoff in ihrem Alaningehalt verändert sind. Um die inflammatorische Wirkung der Mikroorganismen und/oder der Teichon-

säuren messen zu können, werden die Mikroorganismen und/oder Teichonsäuren zusammen mit menschlichen und/oder tierischen Zellen und mindestens einem potentiellen Wirkstoff inkubiert. Bei den menschlichen und/oder tierischen Zellen handelt es sich vorzugsweise um Zellen, insbesondere Immunzellen, die auf eine entsprechende Stimulierung meßbar reagieren. Die Messung der inflammatorischen Wirkung der zu bekämpfenden Mikroorganismen und/oder Teichonsäuren kann durch die Bestimmung eines Cytokins, eines Oberflächenmarkers, einer Signaltransduktionskomponente oder durch die Bestimmung der Degranulations- und/oder der Phagocytoseeffizienz vorgenommen werden. Die Auswahl des zu bestimmenden Signals hängt von dem gewählten Zelltyp ab. Je geringer das gemessene Signal nach Behandlung mit einem potentiellen Wirkstoff ist, umso effektiver ist der Wirkstoff.

Schließlich kann ein Verfahren zur Wirkstoffsuche eingesetzt werden, welches den Einbau von D-Alanin in Teichonsäuren von Gram-positiven Bakterien als Maß für die Wirkung des potentiellen Wirkstoffs einsetzt. Die Messung des Alanineinbaus kann direkt an den Teichonsäuren nach Behandlung der Mikroorganismen mit einem potentiellen Wirkstoff erfolgen, oder es kann die Bindung von D-Alanin an Enzyme des Alanineinbaus und/oder die Umsetzung von D-Alanin durch Enzyme des D-Alanineinbaus bestimmt werden. Der Nachweis des D-Alanins oder der Enzyme kann mit radioaktiven Isotopen, mit Farbstoff- oder Fluoreszenzgruppen, oder mit Antisera, die spezifisch Alanin-substituierte oder nicht-substituierte Teichonsäuren erkennen, erfolgen. Es können auch Antisera eingesetzt werden, die spezifisch Enzyme erkennen, die Alanin gebunden oder nicht gebunden haben.

Um einen potentiellen Wirkstoff zu entwickeln, der beispielsweise in einem der oben beschriebenen Verfahren getestet werden kann, ist es sinnvoll, von einem der Peptide/Proteine auszugehen, die am D-Alanineinbau in Teichonsäuren beteiligt sind. Beispielsweise unter Verwendung von Computer-Modelling-Methoden wird dann, zunächst theoretisch, ein Wirkstoff entwickelt, der mit den natürlichen Peptiden/Proteinen um einen Wechselwirkungspartner, zum Beispiel ein Substrat konkurriert, der aber nicht die biologische Funktion der natürlichen Peptide/Proteine erfüllt. Ein solcher Wirkstoff kann in effektiver Weise die biologische Aktivität der natürlichen, am D-Alanineinbau beteiligten Peptide/Proteine vermindern oder vollständig hemmen.

Eine andere Möglichkeit des Wirkstoff-Designs ist, ein Peptid/Protein des D-Alanineinbaus als Angriffspunkt für den zu entwickelnden Wirkstoff auszuwählen. Beispielsweise mit Hilfe von Computergestützten Modellen kann eine Substanz entwickelt werden, die mit dem natürlichen Peptid/Protein wechselwirkt und dieses hemmt. Die auf Grundlage dieser theoretischen Design-Überlegungen entwickelten potentiellen Wirkstoffe können dann in einem der oben genannten erfindungsgemäßen Verfahren auf ihre Wirksamkeit hin getestet werden.

Weiterhin können die zu testenden Wirkstoffe als Testsubstanzen aus Naturstoffbibliotheken, Peptidbibliotheken, Phage-Display-Bibliotheken oder ähnlichem stammen.

Die beschriebenen Merkmale und weitere Merkmale der Erfindung ergeben sich aus den Figuren und der nachfolgenden Beschreibung von Beispielen in Verbindung mit den Unteransprüchen. Hierbei können die einzelnen Merkmale jeweils für sich oder zu mehreren in Kombination miteinander verwirklicht sein.

Die Figuren zeigen:

Fig. 1 Schematische Struktur von Lipo- und Wandteichonsäuren. Bei den Wandteichonsäuren von *S. aureus* folgen auf die Verbindungseinheit zunächst drei Glycerolp-

hosphateneinheiten, gefolgt von ca. 40 Ribitolphosphateneinheiten. Bei den Wandteichonsäuren von *S. xylosus* liegen Glycerol- und Ribitolphosphateneinheiten im gleichen Mengenverhältnis vor. MurNAc: N-Acetylmuraminsäure; GlcNAc: N-Acetylglucosamin.

Fig. 2 DNA-Sequenz des *dltABCD*-Operons von *Staphylococcus xylosus* C2a.

Fig. 3 DNA-Sequenz des *dltABCD*-Operons von *Staphylococcus aureus* Sa113.

Fig. 4 Struktur und Inaktivierung der *dlt*-Operons von *S. aureus* und *S. xylosus*. Die Positionen von Transposoninsertionen in das *dlt*-Operon von *S. xylosus* (XG4–XG24) sind im oberen Teil dargestellt. Das *dltA*-Gen von *S. aureus* wurde durch homologe Rekombination unter Verwendung des unten dargestellten Plasmides pB1' *dltI* gegen eine Spectinomycin-Resistenzkassette (*spc*) ausgetauscht. T: Transkriptionsterminator.

Fig. 5 AS-Sequenzen und Funktionen der vom *dltABCD*-Operon von *Staphylococcus xylosus* kodierten Peptide/Proteine. Die Positionsangaben beziehen sich auf die DNA-Sequenz aus **Fig. 2**.

Fig. 6 AS-Sequenzen und Funktionen der vom *dltABCD*-Operon von *Staphylococcus aureus* kodierten Peptide/Proteine. Die Positionsangaben beziehen sich auf die DNA-Sequenz aus **Fig. 3**.

Fig. 7 Tabellarische Darstellung des D-Alaninergehalts der Teichonsäuren von *S. aureus* und *S. xylosus* (Wildtyp und *dlt*-Mutanten).

Fig. 8 Tabellarische Darstellung der Aktivität von antimikrobiellen Peptiden gegen die Wildtypstämme *S. aureus* Sa113 und *S. xylosus* C2a sowie die *dlt*-Mutanten *S. aureus* AG1 und *S. xylosus* XG13.

Fig. 9 Graphische Darstellung der Bindung von anionischen und kationischen Proteinen durch *S. aureus*- und *S. xylosus*-Stämme. Wildtyp (a, schwarze Balken), *dltA*-Mutanten (b, weiße Balken) und Wildtyp mit pRBdlt1 (c, grauer Balken) wurden bei neutralem pH mit verschiedenen Proteinen inkubiert und die Menge an ungebundenem Protein im Kulturüberstand wurde bestimmt.

Beispiele

1. Methoden

S. aureus Sa113 (Iordanescu, S. und Surdeanu, M. (1976) *J. Gen. Microbiol.* 96, 277–281), *S. xylosus* C2a (Brückner, R. (1997) *FEMS Microbiol. Lett.* 151, 1–8) und *E. coli* DH5a (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (1990) *Current protocols in molecular biology*, John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y.) wurden in BM-Medium kultiviert (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, 0,1% K₂HPO₄, 0,1% Glucose), solange nichts anderes angegeben ist.

Das Plasmid pTV1ts, welches für die Transposon-Mutagenese eingesetzt wird, enthält ein Temperatursensitives Replikon, ein Chloramphenicol-Resistenzgen und das Transposon Tn917, welches eine Erythromycin-Resistenz vermittelt (Youngman, P., Poth, H., Green, B., York, K., Olmedo, G. und Smith, K. (1989) in *Regulation of procaryotic development* (Smith, I., Slepecky, R.A. und Setlow, P., eds), Seiten 65–87, American Society for Microbiology, Washington, DC). Um eine Sammlung von Mutanten herzustellen, wurde *S. xylosus* (pTV1ts) über Nacht bei 30°C in BM-Medium kultiviert, welches 5 µg Erythromycin/ml und 20 µg Chloramphenicol/ml enthielt. Die Kultur wurde anschließend 100-fach mit BM-Medium verdünnt, welches 2,5 µg Erythromycin/ml enthielt, und für 14 Stunden bei 42°C inkubiert, um Transposon-Insertionsmutanten zu selektionie-

ren. Diese Kultur wurde ein weiteres Mal in der gleichen Weise verdünnt und für weitere 14 Stunden bei 42°C kultiviert. Aliquots der Bakteriensuspension wurden auf BM-Agarplatten, welche 2,5 µg Erythromycin/ml enthielten, ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Mutanten-Klone (4000) wurden auf BM-Agarplatten, welche 3 µg Gallidermin/ml enthielten, transferiert und hinsichtlich verschlechtertem Wachstum auf Gallidermin ausgewählt.

DNA wurde durch Zyklus-Sequenzierung (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (1990) *Current protocols in molecular biology*, John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y.) in einem DNA-Sequenzierungsgerät 4000 L (LI-COR Inc., Lincoln, Neb., USA) sequenziert, wobei das Thermo-sequenasefluoreszenz-markierte Zyklus-Sequenzierungskit (Amersham, Little Chalfont, UK) verwendet wurde.

Um das *dltA*-Gen von *S. aureus* Sa113 durch ein Spectinomycin-Resistenzgen zu ersetzen, wurden DNA-Fragmente von je 1,5 kb, welche *dltA* flankieren, durch PCR amplifiziert, über die *Sma*I-Schnittstelle von pUC18 gemäß Standardmethoden kloniert (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (1990) *Current protocols in molecular biology*, John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y.) und anschließend sequenziert. Durch Schneiden mit *Sph*I/*Sac*I bzw. *Bam*HI/*Eco*RI wurden die auf- und abwärtsliegenden Fragmente aus dem resultierenden Plasmid isoliert und in das Temperatursensitive Plasmid pBT2 (Brückner, R. (1997) *FEMS Microbiol. Lett.* 151, 1–8) zusammen mit dem 1277 bp *Sac*I-*Bam*HI-Fragment eingefügt, welches für ein Spectinomycin-Adenyltransferase-Gen (*spc*) von Tn554 (Murphy, E., Huwyler, L. und de Freire Bastos, M.d.C. (1985) *EMBO J.* 4, 3357–3365) kodiert, wie in **Fig. 4**, unterer Teil, dargestellt ist.

Das resultierende Plasmid pBT Δ *dltI* wurde in *S. aureus* Sa113 durch Elektroporation eingebracht (Augustin, J. und Götz, F. (1990) *FEMS Microbiol. Lett.* 66, 203–208). Durch Inkubation bei 42°C und nachfolgender Suche nach Spectinomycin-resistenten Klonen ohne die Plasmid-kodierte Chloramphenicol-Resistenz, wurde die Mutante AG1 identifiziert, welche das *spc*-Gen anstatt des *dltA*-Gens enthält. Die korrekte Integration von *spc* wurde durch Sequenzierung der DNA verifiziert.

Das Plasmid pRBdlt1 wurde durch Ligation eines 4655 bp-PCR-Fragmentes, welches das *dltABCD*-Operon von *S. xylosus* C2a umfaßte, zusammen mit 393 bp aufwärts von dem *dltA*-Startcodon mit der mutmaßlichen Promotor-Region und 185 bp abwärts des *dltD*-Stopcodons mit der Terminator-Struktur in die *Sma*I-Schnittstelle von pUC18 konstruiert. Nach der Sequenz-Analyse wurde das Fragment durch Schneiden mit *Bam*HI-*Eco*RI aus dem resultierenden Plasmid isoliert, in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pRB473 (Brückner, R. (1992) *Gene* 122, 187–192) kloniert und in *S. xylosus* C2a und *S. aureus* Sa113 durch Elektroporation eingebracht (Augustin, J. und Götz, F. (1990) *FEMS Microb. Lett.* 66, 203–208).

Für Komplementations-Versuche wurden Mutanten mit dem Plasmid pRBdlt1 transformiert. Hierfür wurden Protoplasten von Mutanten mit Wildtyp-Protoplasten, welche dieses Plasmid enthielten, fusioniert und anschließend auf die Spectinomycin-Resistenz (*S. aureus*) oder Erythromycin-Resistenz (*S. xylosus*) und die Plasmid-kodierte Chloramphenicol-Resistenz selektioniert. Die Protoplasten-Fusion wurde wie in Götz, F., Ahrne, S. und Lindberg, M. (1981) *J. Bacteriol.* 145, 74–81 beschrieben, durchgeführt. Die resultierenden Klone wurden durch Analyse von Restriktions-Fragmenten und DNA-Sequenzierung überprüft.

Für die Isolierung der Teichonsäuren wurden die Bakte-

rien über Nacht in 500 ml BM-Medium, welches 0,25% (S. xylosus) oder 0,3% Glucose (S. aureus) enthielt, kultiviert, durch Zentrifugation geerntet und mit 100 ml Natrium-Acetatpuffer gewaschen (20 mM, pH 4,6). Der Zellaufschluß erfolgte in dem gleichen Puffer unter Verwendung von Glas-
 kugeln in einem Disintegrator S (Biomatik GmbH, Rodgau, Deutschland) wie beschrieben (Peschel, A., Ottenwälder, B. und Götz, F. (1996) FEMS Microbiol. Lett. 137, 279–284).

Um Zellwand-Teichonsäuren (WTA) zu isolieren, wurden 500 µl-Aliquots des Zellextrakts vierfach in Natrium-Acetatpuffer verdünnt, welcher 2% SDS (Natrium-Dodecylsulfat) enthielt, für 15 Minuten sonifiziert und anschließend 1 Stunde bei 60°C heftig geschüttelt. Die Zellwände wurden durch Zentrifugation sedimentiert, wiederholt mit Natrium-Acetatpuffer gewaschen und schließlich in 1 ml Natrium-Acetatpuffer resuspendiert. WTA wurde extrahiert, indem 250 µl der gereinigten Zellwände vierfach in 5% TCA (Trichloressigsäure) verdünnt und für 4 Stunden bei 60°C inkubiert wurden. Das Peptidoglycan wurde durch Zentrifugation entfernt.

Für die Isolation von Lipoteichonsäuren (LTA) wurden 250 µl des Zellextrakts zweifach mit Natrium-Acetatpuffer verdünnt. Nach einer Extraktion mit 500 µl wässrigem Phenol wurde 1 Stunde bei 60°C heftig geschüttelt. Anschließend erfolgte eine hydrophobe Interaktions-Chromatographie. Die chromatographische Reinigung wurde im wesentlichen wie in Koch, H.U., Haas, R. und Fischer, W. (1984) Eur. J. Biochem. 138, 357–363 beschrieben, durchgeführt. Die wässrige Phase wurde weiter verdünnt durch Zusatz von 250 µl Natrium-Acetatpuffer, mit 500 µl Octyl-Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) gemischt, welche mit Natrium-Acetatpuffer equilibriert worden war, und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde in eine Ultrafree-MC-Zentrifugationsfiltereinheit mit 0,45 µm Porengröße (Millipore, Bedford, Mass., USA) gegeben, und das Lösungsmittel durch Zentrifugation für 1 Minute bei 340 × g entfernt. Nach drei Waschschritten, jeweils mit 500 µl 15% 1-Propanol in Natrium-Acetatpuffer, wurden die Lipoteichonsäuren durch Resuspendierung des Gels in 500 µl 50% 1-Propanol in Natrium-Acetatpuffer und Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur eluiert. Nach Sammlung des Eluats durch Zentrifugation wurde die Elutions-Prozedur wiederholt und die Eluate vereinigt.

Die Analyse von D-Alanin in Teichonsäuren wurde gemäß der in Pollack, J.H. und Neuhaus, F.C. (1994) J. Bacteriol. 176, 7252–7259 beschriebenen Methode durchgeführt. WTA- und LTA-Proben wurden auf pH 9–10 mit NaOH bis auf ein Volumen von 100 µl eingestellt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert, um die D-Alaninester zu hydrolisieren. Tris-HCl (200 µl, 0,2 M, pH 8,4), welches 2,5 mg D-Aminosäure-Oxidase/ml (1,3 U/mg; Sigma, St. Louis, Mo., USA) enthielt, wurde zugesetzt, und die Proben wurden 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 µl 30% TCA gestoppt und die gefällten Proteine durch Zentrifugation entfernt. 2,4-Dinitrophenylhydrazin (100 µl einer 0,1%-Lösung, hergestellt in 2 M HCl) wurde dem Überstand zugesetzt und 5 Minuten inkubiert. Nach Zusatz von 200 µl 2,5 M NaOH wurde die Absorption bei 525 nm bestimmt. Der Gehalt von Phosphor in WTA- und LTA-Proben wurde gemäß Chen et al. (Chen, P.S., Toribara, T.Y. und Warner, H. (1956) Anal. Chem. 28, 1756–1758) bestimmt.

Das antimikrobielle Peptid Defensin HNP1–3 wurde aus humanen peripheren Blut-Neutrophilen wie beschrieben isoliert (Harwig, S.S.L., Ganz, L. und Lehrer, R.I. (1994) Methods Enzymol. 236, 160–172). Um die Ausbeute zu verbessern, wurde Blut von einem Patienten, der mit dem Granulocyten-Koloniestimulierenden Faktor behandelt worden

war, verwendet. Die Defensin-Peptide wurden aus den Granula der Granulocyten durch Extraktion mit 5% Essigsäure angereichert. Eine weitere Reinigung durch RP-HPLC (reversed phase high performance liquid chromatography) ergab eine Ausbeute von 5,1 mg der Defensin-Peptide aus 500 ml Blut. Die lyophilisierten Proben wurden bei 4°C gelagert und in 0,01% Essigsäure in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. Das Produkt bestand aus den drei Defensin-Varianten HNP1, HNP2 und HNP3, welche nur in der ersten Aminosäure unterschiedlich sind.

Die Protegrine 3 und 5 (Aumelas, A., Mangoni, M., Roumestand, C., Chiche, L., Despau, E., Grassy, G., Calas, B. und Chavanieu, A. (1996) Eur. J. Biochem. 273, 575–583) und die Tachyplesine 1 und 3 (Iwanaga, S., Muta, T., Shigenaga, T., Seki, N., Kawano, K., Katsu, T. und Kawabata, S. (1994) Ciba Found. Symp. 186, 160–175) wurden durch Standardmethoden synthetisiert (Jung, G. und Beck-Sickinger, A. (1992) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 31, 367–383). Alle Peptide wurden als Peptidamide synthetisiert. Nach einer Lyophilisierung wurden die linearen Peptide in einer Reinheit von 75–82% erhalten. Die Faltung dieser Peptide wurde durch die Methode von Aumelas et al. nach Tam et al. (Aumelas, A., Mangoni, M., Roumestand, C., Chiche, L., Despau, E., Grassy, G., Calas, B. und Chavanieu, A. (1996) Eur. J. Biochem. 273, 575–583 und Tam, J.P., Cui-Wong, W., Liu, W. und Zhang, J.-W. (1991) J. Am. Chem. Soc. 113, 6657–6662) erreicht. Hierfür wurden die linearen Peptide in 30% wässrigen Isopropanol (0,8 mg/ml) gelöst und anschließend langsam und unter Rühren in Faltungs-Puffer (25% Dimethylsulfoxid, 10% Isopropanol, 0,1 M Tris-HCl, final pH 6,8) in einem Verhältnis von 1,5 ml Peptidlösung zu 4 ml Faltungs-Puffer zugegeben (finale Peptidkonzentration um 0,22 mg/ml). Die Reaktion wurde in geschlossenen Glasgefäßen mit langsamem Rühren für 24 Stunden durchgeführt. Anschließend wurden 150 µl-Proben periodisch entnommen, welche durch Zusatz von 10 µl TFA (Trifluoressigsäure) angesäuert wurden und durch RP-HPLC charakterisiert wurden. Die Reinheit des gefalteten Produktes betrug 56–69%, wie durch RP-HPLC festgestellt wurde. Vor einer weiteren Reinigung wurden die Proben bei –20°C gelagert. Die Reinigung der Peptide erfolgte durch eine semipräparative RP-HPLC unter Verwendung von Acetonitril-Gradienten in 0,1% TFA.

Um die Sensitivität von Bakterien gegenüber antimikrobiellen Substanzen zu bestimmen, wurde die minimale inhibitorische Konzentration verschiedener derartiger Substanzen bestimmt. In einem seriellen Verdünnungstest wurde LB-Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl), welches ansteigende Konzentrationen der antimikrobiellen Peptide enthielt, mit 1/100 Volumen Vorkultur beimpft. Die antimikrobiellen Peptide waren Gallidermin (Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach, Deutschland), Nisin, synthetisches (A8, 13, 18)-Magainin II Amid, Gramicidin D und Polylysin (durchschnittliche Molekularmasse 3,97 kDa) (alle von Sigma) sowie die oben erwähnten Defensine und Protegrine. Die Kulturen wurden bis zum Erreichen der stationären Phase kultiviert. Die Trübung der Kulturen wurde bei 590 nm beobachtet. Da die Aktivität von humanen Defensinen sehr empfindlich gegenüber Salzkonzentrationen ist (Harwig, S. S. L., Ganz, L. und Lehrer, R.I. (1994) Methods Enzymol. 236, 160–172), wurde das LB-Medium ohne NaCl und mit nur der Hälfte der Trypton- und Hefeextrakt-Menge eingesetzt. Die getesteten Stämme zeigten in diesem Medium ausreichendes Wachstum.

Um die Interaktion von anionischen und kationischen Proteinen mit den Bakterien, insbesondere mit den Mutanten, zu analysieren, wurde die Bindung von GFP (grünes fluoreszierendes Protein), Cytochrom c und Gallidermin ge-

testet. Die Bakterien wurden bis zur stationären Phase in BM-Medium kultiviert und durch Zentrifugation geerntet. Die Zellen wurden zweimal mit Natrium-Phosphatpuffer (100 mM, pH 7) für die Inkubation mit GFP (Clontech Laboratories, Palo Alto, Calif., USA) und mit Gallidermin gewaschen. Für die Inkubation mit Cytochrom c (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde MOPS-Puffer (20 mM, pH 7) eingesetzt. Die Zellen wurden in dem gleichen Puffer bis zu einer finalen optischen Dichte bei 578 nm von 7 (GFP und Cytochrom c) oder bis zu einer optischen Dichte bei 578 nm von 4 (Gallidermin) resuspendiert, für 10 Minuten mit 0,5 µg Protein/ml (GFP und Gallidermin) oder 0,5 mg Protein/ml (Cytochrom c) inkubiert und anschließend durch Zentrifugation entfernt. Die Menge von GFP im Überstand wurde fluorometrisch analysiert (Anregung bei 395 nm, Emission bei 509 nm). Cytochrom c wurde photometrisch bei 530 nm, dem Absorptionsmaximum der prosthetischen Gruppe, quantifiziert. Die Menge von Gallidermin im Überstand wurde durch RP-HPLC-Analyse unter Verwendung eines linearen Gradienten von 30 bis 60% Acetonitril in 0,1% TFA über 20 Säulenvolumen in einer Spherisorb ODS2-Säule (Grom Analytik, Herrenberg, Deutschland) bestimmt.

2. Ergebnisse

Beispiel I

Die *dlt*-Gene sind für den Einbau von D-Alanin in die Teichonsäuren verantwortlich

Die Teichonsäuren von *dlt*-Mutanten von *Staphylococcus aureus* (AG1) und *Staphylococcus xylosus* (XG13, XG4, XG24) wurden isoliert. Als Maß für den D-Alanineinbau in die Teichonsäuren wurde das molare Verhältnis von D-Alanin zu Phosphor bestimmt. Bei den Mutanten wurde kein D-Alanin in den Teichonsäuren gefunden, während bei den Wildtypstämmen zwischen 15 und 95% der Alditolphosphateinheiten mit D-Alanin verestert waren (Fig. 7). Komplementation der Mutanten mit dem Plasmid pRBdlt1, auf dem sich das *dlt*-Operon von *Staphylococcus xylosus* befindet, bewirkte einen normalen D-Alanin Gehalt der Teichonsäuren. Wenn die *dlt*-Genkopienzahl durch Transformation der Wildtypstämmen mit pRBdlt1 erhöht wurde, konnte eine Erhöhung des D-Alanin Gehaltes der Teichonsäuren beobachtet werden.

Beispiel II

Der D-Alanin Gehalt der Teichonsäuren beeinflusst die Sensitivität gegenüber kationischen antimikrobiellen Substanzen

Die *dlt*-Mutanten zeichnen sich gegenüber dem Wildtyp durch eine erhöhte Sensitivität für diverse kationische Membran-aktive Peptide, wie humanes Defensin HNP1–3, Protegrin 3 und 5 vom Schwein, Tachyplesine 1 und 3 vom Pfeilschwanzkrebs, Magainin II vom Krallenfrosch, Gallidermin von *Staphylococcus gallinarum* und Nisin von *Lactococcus lactis* (Fig. 8) aus. Ähnliche Ergebnisse wurden mit den Substanzen Melittin, Mastoparan, Protamin, Gramicidin S und Polymyxin B erzielt (Daten nicht gezeigt). Bei Gramicidin D, das keine Ladung trägt, wurde keine erhöhte Sensitivität der *dlt*-Mutanten beobachtet (Fig. 8). Bei diversen kationischen antimikrobiellen Peptiden bewirkte eine Erhöhung der *dlt*-Genkopienzahl durch Transformation der Wildtypstämmen mit pRBdlt1 eine Verminderung der Sensitivität. Die Komplementation der Mutanten mit Plasmid pRBdlt1 führte zur Wiederherstellung der Wildtyp-Toleranz.

Die Mutanten waren nicht sensitiv für Polylysin, was darauf hinweist, daß kationische Eigenschaften eines Peptides nicht für eine antimikrobielle Aktivität gegen die *dlt*-Mutanten ausreichen.

Beispiel III

Der D-Alanin Gehalt der Teichonsäuren beeinflusst die Fähigkeit, anionische und kationische Proteine zu binden

Die D-Alaninester führen positiv-geladene Aminogruppen in die ansonsten stark negativ-geladenen Teichonsäuren ein. Der Verlust der D-Alaninester sollte somit zu einer stärker negativen Ladung der Bakterienzellwand führen. Die Wildtypstämmen, die *dlt*-Mutanten und Wildtypstämmen mit Plasmid pRBdlt1 wurden mit dem anionischen Protein GFP (green fluorescent protein) und den kationischen Proteinen Cytochrom c und Gallidermin inkubiert. Der Anteil an nicht gebundenem Protein im Kulturüberstand wurde nach Entfernung der Bakterienzellen bestimmt (Fig. 9). Die Mutanten zeigten eine verminderte Fähigkeit zur Bindung von kationischem GFP, während anionisches Cytochrom c und Gallidermin verstärkt gebunden wurden. Wildtypstämmen mit pRBdlt1 zeigten umgekehrtes Verhalten.

Beispiel IV

Der Alanin Gehalt der Teichonsäuren beeinflusst die Fähigkeit von *Staphylococcus aureus* auf Plastik- und Glasoberflächen einen Biofilm zu bilden

Staphylococcus aureus und andere Staphylokokken sind dazu in der Lage, sich auf implantierten Plastikmaterialien, wie Kathetern, Herzklappen, Herzschrittmachern usw. anzusiedeln, was zu folgenschweren Infektionen bis hin zur lebensbedrohlichen Sepsis führen kann. Die Fähigkeit zur Biofilmbildung läßt sich in vitro durch Kultivierung der Bakterien in Polystyrol- und Glasgefäßen überprüfen. Eine wichtige Rolle bei der Biofilmbildung spielt ein schleimbildendes N-Acetyl-Glucosaminpolymer (PIA), das für die interzelluläre Adhäsion der Bakterien verantwortlich ist (Heilmann, C., O. Schweizer, C. Gerke, N. Vanittanakom, D. Mack, and F. Götz, 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. Mol. Microbiol. 20: 1083–1091). Während der Wildtypstamm *Staphylococcus aureus* Sa113 auf Polystyrol und Glas konfluentes Wachstum aufwies und auch beim Waschen der Oberflächen mit Saline nicht entfernt wurde, zeigte die *Staphylococcus aureus*-Mutante AG1 (Inaktivierung von *dltA*) kein konfluentes Wachstum. Sie wurde beim Entleeren der entsprechenden Gefäße mit dem Medium ausgeleert; ein Haften an den Oberflächen wurde nicht beobachtet.

Patentansprüche

1. DNA-Sequenz von *Staphylococcus xylosus* gemäß Fig. 2 oder Fragmente davon.
2. DNA-Sequenz von *Staphylococcus aureus* gemäß Fig. 3 oder Fragmente davon.
3. DNA-Sequenz, dadurch gekennzeichnet, daß sie unter stringenten Bedingungen mit der DNA-Sequenz gemäß Fig. 2 oder mit der DNA-Sequenz gemäß Fig. 3 oder Fragmenten davon hybridisiert.
4. DNA-Sequenz, dadurch gekennzeichnet, daß sie für mindestens ein Peptid/Protein mit den in Fig. 5 oder Fig. 6 angegebenen Aminosäuresequenzen kodiert.
5. DNA-Sequenz nach einem der vorhergehenden An-

sprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens eine Mutation, insbesondere eine Insertion oder Deletion, aufweist, wobei vorzugsweise eine Mutation in einem für Peptide/Proteine kodierenden Abschnitt der Sequenz vorhanden ist. 5

6. DNA-Sequenz nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eines der von der DNA-Sequenz kodierten Peptide/Proteine in seiner biologischen Funktion gestört, insbesondere inaktiviert, ist.

7. DNA-Sequenz nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das von der DNA-Sequenz kodierte Peptid/Protein am Einbau von D-Alanin in Teichonsäuren von Gram-positiven Bakterien beteiligt ist. 10

8. Genprodukt abgeleitet von mindestens einer DNA-Sequenz nach einem der vorhergehenden Ansprüche. 15

9. Peptid/Protein mit einer der in den **Fig. 5** oder 6 angegebenen Aminosäure.

10. Peptid/Protein nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es am Einbau von D-Alanin in Teichonsäuren von Gram-positiven Bakterien beteiligt ist. 20

11. Vektor, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens einen Teil einer DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 7, insbesondere nach einem der Ansprüche 5 und 6, aufweist. 25

12. Vektor nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens einen für ein Peptid/Protein kodierenden Abschnitt einer DNA-Sequenz aufweist.

13. Vektor nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß der kodierende Abschnitt mindestens eine Mutation aufweist. 30

14. Vektor nach Ansprüche 12 oder Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid/Protein am Einbau von D-Alanin in Teichonsäuren von Gram-positiven Bakterien beteiligt ist. 35

15. Organismus, insbesondere bakterieller Mikroorganismus, dadurch gekennzeichnet, daß der Organismus eine veränderte Expression von mindestens einem der Gene aufweist, die für Peptide/Proteine kodieren, die am Einbau von D-Alanin in Teichonsäuren beteiligt sind. 40

16. Organismus nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eines der Gene überexprimiert ist.

17. Organismus nach Anspruch 15 oder Anspruch 16, 45

dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eines der Gene in seiner Expression vermindert, bevorzugt ausgeschaltet, ist.

18. Teichonsäure, die von einem Organismus gemäß einem der Ansprüche 15 bis 17 gebildet ist und/oder in ihrer Struktur gegenüber natürlich vorkommenden Teichonsäuren verändert ist. 50

19. Wirkstoff, der direkt und/oder indirekt die Wirkung von Teichonsäuren, insbesondere deren inflammatorische Wirkung auf Zellen, insbesondere auf menschliche und/oder tierische Zellen, beeinflusst, vorzugsweise vermindert. 55

20. Wirkstoff nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff den Einbau von D-Alanin in Teichonsäuren beeinflusst, vorzugsweise vermindert. 60

21. Wirkstoff nach Anspruch 19 oder Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff mindestens ein Peptid/Protein, welches am Einbau von D-Alanin in Teichonsäuren von Gram-positiven Bakterien beteiligt ist, in seiner Aktivität beeinflusst, vorzugsweise 65

hemmt.

22. Wirkstoff, insbesondere nach einem der Ansprüche 19 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirk-

stoff die Sensitivität von Mikroorganismen gegenüber antimikrobiellen Substanzen beeinflusst, vorzugsweise erhöht.

23. Wirkstoff nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen Bakterien sind, insbesondere Grampositive Bakterien.

24. Wirkstoff nach Anspruch 22 oder Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den antimikrobiellen Substanzen um kationische antimikrobielle Peptide, insbesondere Host defense-Peptide und/oder bakterielle antimikrobielle Peptide handelt.

25. Wirkstoff, insbesondere nach einem der Ansprüche 19 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß er die Biofilmbildung von Mikroorganismen, insbesondere Staphylokokken, an Oberflächen, insbesondere Glas-, Metall- oder Kunststoffoberflächen, beeinflusst, vorzugsweise verringert.

26. Wirkstoff nach einem der Ansprüche 19 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Peptid oder Protein ist.

27. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens einen Wirkstoff mit mindestens einem der Merkmale gemäß mindestens einem der Ansprüche 19 bis 26 in einer wirksamen Menge sowie vorzugsweise mindestens einen pharmazeutischen Träger enthält.

28. Verwendung mindestens eines Wirkstoffs nach mindestens einem der Ansprüche 19 bis 26 oder der pharmazeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 27 zur Behandlung von Krankheiten, die mit bakteriellen Infektionen in Zusammenhang stehen.

29. Verfahren zur Bereitstellung eines Wirkstoffes mit mindestens einem der Merkmale nach mindestens einem der Ansprüche 19 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Sensitivität von Mikroorganismen gegenüber antimikrobiellen Substanzen als Maß für die Wirkung des potentiellen Wirkstoffs bestimmt wird, umfassend

- a) eine Behandlung von Mikroorganismen mit mindestens einer antimikrobiellen Substanz,
- b) eine Inkubation mit mindestens einem potentiellen Wirkstoff und
- c) die Bestimmung von Wachstums- und/oder Überlebensraten der Mikroorganismen.

30. Verfahren zur Bereitstellung eines Wirkstoffes mit mindestens einem der Merkmale nach mindestens einem der Ansprüche 19 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Biofilmbildung von Mikroorganismen als Maß für die Wirkung des potentiellen Wirkstoffs bestimmt wird, umfassend

- a) eine Inkubation von Mikroorganismen mit mindestens einem potentiellen Wirkstoff und
- b) die Bestimmung von mindestens einem schleimbildenden Protein und/oder die Bestimmung von Schleimsubstanz und/oder die Bestimmung von adhärierenden Mikroorganismen.

31. Verfahren zur Bereitstellung eines Wirkstoffes mit mindestens einem der Merkmale nach mindestens einem der Ansprüche 19 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß die inflammatorische Wirkung von Mikroorganismen und/oder Teichonsäuren als Maß für die Wirkung des potentiellen Wirkstoffs bestimmt wird, umfassend

- a) eine Inkubation von Mikroorganismen und/oder Teichonsäuren zusammen mit menschlichen und/oder tierischen Zellen mit mindestens einem potentiellen Wirkstoff und
- b) die Bestimmung von mindestens einem Cytokin und/oder mindestens einem Oberflächenmarker und/oder mindestens einer Signaltransdukti-

onskomponente und/oder die Bestimmung der Degranulations- und/oder der Phagozytoseeffizienz.

32. Verfahren zur Bereitstellung eines Wirkstoffes mit mindestens einem der Merkmale nach mindestens einem der Ansprüche 19 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß der Einbau von D-Alanin in Teichonsäuren als Maß für die Wirkung des potentiellen Wirkstoffs bestimmt wird, umfassend

- a) eine Inkubation von Mikroorganismen mit mindestens einem potentiellen Wirkstoff und
- b) die Bestimmung des Einbaus von D-Alanin und/oder der Bindung von D-Alanin an Enzyme des D-Alanineinbaus und/oder der Umsetzung von D-Alanin durch Enzyme des D-Alanineinbaus.

Hierzu 10 Seite(n) Zeichnungen

20

25

30

35

40

45

50

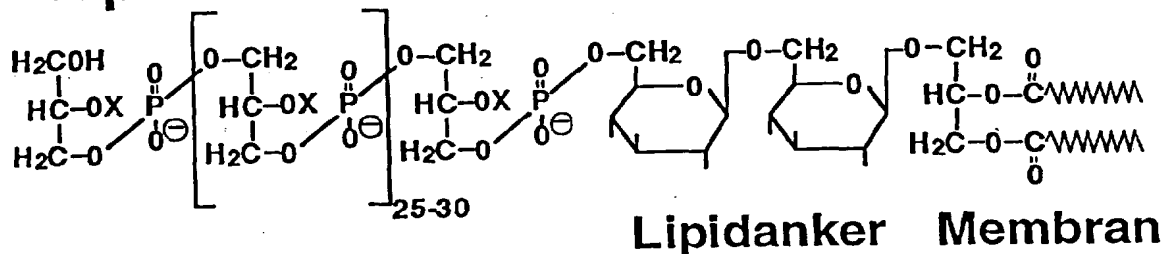
55

60

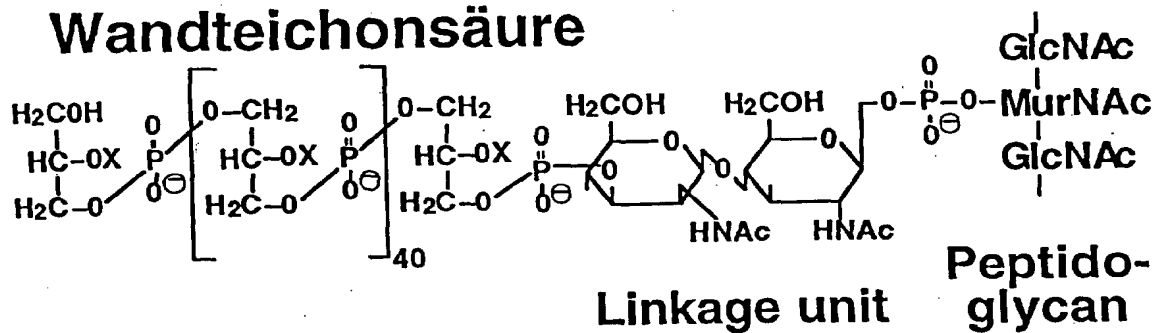
65

- Leerseite -

Lipoteichonsäure



Wandteichonsäure



(X = D-Alanin / Glycosylreste / H)

Fig. 1

ataaattatctggcgaggctgctgtcgtagatgaagagccacacgtgtaactctggtctaaataaagaaagattgcagcttgc
tggactagatgttctcgtgaagagccaatagatatggcacatcctttatttagagatggacaatgcagttatagttcc
acatatgttggagcgcgtctgtctacaacccagaataatcgtatgtatccaattatgtgttgataataaagattagttataa
taaccaacctgtctaaaacgccagtcgaatttaataaataacattgttaaatagatgatatcaaatatttggattatcat
atcctaagataaaagcaaaataaggtagagcgttatacttctctgtaatatagaaaacacacctctgttttaaatagagg
tgtattttttatgtggaatttttaattaatagattataaatcatgatgtgaagaataaccggttttaaaaataaccaattgt
gcgaattttgttaagaatttgacacggtttaaatgcgtacacatataatttttttgaagcgtataataataattttct
aaaatcatgtatttttccgcataaaaaatttatattttccgtcgcattatgtattgtctactaaacattcttatatg
tgtatagatagtaataaacaccttgaagtttatagcgttaataacagtggtttttaaccaatgatttgaacaaagcatcacaa
tattacaacgataataaataataaattcgatcatattatgcgaataattatctaaagataaaacaaatgtttggtttta
taaaacactataaaataaaccaattcaacatttttggttatatataataatgtttaatcgatttgtcacaacatcataaaa
aatgtataataaagttggtaaaatgtttaagtagtgttaaatcgtgctacaacaaaaaacttacatatgtaataataat
taataataataaaaaatagctcgtgaagagagtaaaaaatgcgtaaagagatggaaaaatcacgacgaataatcaaaaaa
ttaaacattgggttatttaactcttttatatttggcaattttatagcactgtatttaattatggcttcggagatcgc
ataataacttttttataatgaatttttagtcggaggagaatagtataaggatattatatcttctaattggaanaatga
aaaaatgtaccctgagcaaatagcgtataaagcataatcacagatgtattaacgttatcgtgagttaaatcaatatgcaaa
taaacctgcagacttaatacaagatacttaagagcccaattatcgttatgttcattgtcgccatttatgtattgttagg
tatgattgccagatgaagaagcggatgtgttatgttacccttgatatatcaatgcctgaagcgtattataactat
tattgaaaaaatacaacctgatttttattttataacaagtgaaacttcgttagatagtaaatggcagagaaaatcgtaaa
tactgaaacacttttgacggtataatcgtaacggtgaatttgaactctaaaattaaagatcaagatattgcgtataccat
ttttacatcgggctctacaggggaacctaaggcgtaacaaatagatacgaagtgcttaacgaatttacgaactggat
ggtagatttgaataaaaataggtgagaatcaaacagtggttaaatcaagtcacatttccatttgatttatctgtgtaggc
aattttatccatggttttagctactgcaaggaacataaatttttagtagataaaacaaatgatttaacaagcctaaattataa
tgatatgttagagcaacttaaaaaataaatttgggtgtctacacacttatgtggaatttggtgaaatgttaccttaa
tttagctgaaacacattagaagtttgaagaatttttcttttggtagaaattttacctctaaataactgctaagat
gttgttgcaacgctttccatctgcataattttataatacatatggacctacagaagcgacagtcgcagttacagagtat
cttaattactgaagcggctgatttaatacatataatccatctacctgtgggaaagcgagacaggcagccaattatcttt
agcagaataatgaagaattgatcattttctggcaaatgtgtgaagtgaaggttatgtgaagatgagcaacgcttctaagta
agtggtttaaagatatagataaacagtaaatcttactttactggggataaagcaacagttcaagatgacctatggtttat
cactggcagctatagattttcaagtgaaactaaatgggtatcgcatggaagtagaagaataagaatttcaattaaagaca
aatagatgttgtcaagaagcaattgtgttaccagtatcaaaaaataaagtagaacgaattcaagggtgttgtagt
cttaaatgacttaaatgatgacaagaatgaacaacccgtgatcatagattataaacaagaacttaaacacagcagatgcc
agaatatatgattccaagaagaattatattttaaagagcaatttcttttaacaatttaattggaaaattagatcgtaaagca
gattgccggaggtgattatagcatgatccatccagcacattacattctttcttatagcatttatagttcttaattccg
tgtattatattaggttttaactggaaaaagcgcgtatttataatgcatgaagtacagctattatgattgtgtcatt
tttctctcagataaaacataattttatttggccaatcatatttaagtggtcaacttataaactttgctttatatctgttg
tggcaagtagcaatcatattgtttttaggaattcagctgcgaaaaacatttcaattataaagttttccacagtgatt
gcattatcgatatgtgccatttgtattgtgtaaggtaatgcaaaagtcgttggtttggggctgcacaattaaagctcat
gaaaaataagggtgatlgagtttataggtctcttaggtatttcttatgttactttcaaaaagtggttcaattattaatggaa
attcgcgatggttcaataaaagaagtgaaagctactaaagatttcaatttcaatttcttttccctacaatttcaatc
ggtccaatttgaccgctacaaacgctttgtttaagatgaaagtagatacaaaagtagcgaaagttatcgagcatcgcta
ataaagaacatacatcttcatcgttaggtttttgtataataacattatgtcttatttaatacaagatttatgcgatt
aatccattaatgttagatttttcaaatttcactgctaaatgttttatatgtatgcatatagtttgtatctatctctc
gacttcgctggttattcatttttgcgatggcatttagctatttatatgggtatcacagacgcacaaaacttaagcaac
catttaagaagcaagaattatacaggtatttttggaaatagatgcatatgtctttctcttctgttttagggattgtatc
tatatgagagccttattctttatgtcgaaaaaacgcttattaaaaaatcaatttacaatgtctaataattgctttctc
ttaaactttttaaatttggttatttggcatggcattgaagttcatattatttggattgtttatatccacagcagtttta
tttattggtttatggattattgaaaaatggcgaaaaaacctcgcgaagaatgtctacaacatacaacaattgta
agtattatcgtttacattccattttgttaacggtttggttttcttatctttctgggaaactgttttaattagaggaggat
ttattatggaatttagagaacaagattagatttttaactgaagttgctgaaataatgtcattaaggaaaaatccag
atgtagaacttttgaagaggggattttgattctttcaaacggttaggtcttttactagagattcaaaaataaattag
atattgaagtatcgtattatgattttttagatagatgaatggcgacaccttaacaagatttagaggtattagaagaat
tacgatgaagtttaaaccgctttatacctattttgaagtccttattgtattgtttggaattttcttagtataccagcaag
ttggttcgctggatttaataatccaagcacagtagctacgcaaggtgtgctctaacagatcaagttacaaaaggaaac
tctagtgcagaataaaattgtcaactctgatgcttatctcgatatatggttccagtggaattagaaaagacgcatcc
atttaactcctgcaatcttataataatcgaaatcaagttagtaagaacaccttcttaattggtagctgggtgtcgac
agatttagtaaaacgctgtggaactaggttcaacaattggaattttaaaaggttaaaaaatggcattattgttgcgc
acagtggttttacaaaaaatggcttaacgcaagataattttaaggcgcgtattttaaaggcacagctcaactcagttgtt
taagcaagaacaatttaagccagaacttaagcaacggttatgctaaacgattattacaatttaaaagatgtggaataatcg
cgtatatttagaaaagttgcacaaggaaaaatcacagaataataaatttatcttcaaaacttaaaagtagaacaatt
gaagaataatgaagctattaaagcgttatcttcttagaanaaacacctgctatcgcatctcgatcttatcatcaaaa
aaatgattcttgggtatgtgtgatgacaaaagctgaactctatggcgctaaacatcaaaaaacaaatgaatttgggtat
tcgagatgaatattgggatttaattaaaaaacataaacgaaaaatatacgaaaccatgaatttagggagaattctctc
tgaatttaaaagatttagagttactttagatcacattacgagaacggtggcgggattgttattataataatctaccttc
taacggtaagttggtatgatcacatttggattatagaagtagacgtcgaaaaatatataaaaaattgataaaacaaat
agtggtcatggtggacagacatcgatatgtcgataaagactacgaacctatgttgttaagtgatgcagttcatat
tggctggaagaagctgggtatacatcatcaataaaattatcgatgaacattatgcacagaataataaaaaaaccttca
acatgtacacactttaaagtaaatgttgaagagtttttcgcgttaaaaaataaacaagcacaattgaaaaaacatt

Fig. 2

```

1 gctgaattag aaaaatagat atagtcattt tataaagtag gtgaattgat ttggtaaaaa
61 tagttgtttc gaggaatatt ccagataaat tttatcaaca attaagtaaa cttgggtgacg
121 ttgttatgtg gcaaaaatca ttagtgccca tgcctaaaga tcaattttgtg acagcacttc
181 gtgacgcaga tgcttggtttt attacattaa gtgaacagat cgatgcagaa attttagcgc
241 aatcaccaaaa tttaaaagta attgccaata tggctgtagg atatgacaac atcgatgttg
301 aaagtgaac agcgaataac gtggttgcca cgaatacacc aaatgtactt actgaaacaa
361 ctgcagaatt aggattttaca ttaatgcttg ctatagcagc cagtattgta gaagctgaaa
421 aatatgtaga agcagatgca tggcaaaagct ggggtcctta tttattgtca ggtaaaagtg
481 tcttcaattc aactattgga atatatggta tgggagatat tggtaaaagct tttgcaagaa
541 gggtgcaagg gtttaatact aatattcttt atcataatcg atcaagacat aaagatgcag
601 aggcggactt taatgcaaca tatgtttctt ttgaaacggt gttagcagaa agtgatttta
661 tcatctgtac agcgcactt acaaaagaaa cacatcataa atttaatgct gaagcatttg
721 aacaaatgaa aaatgatgca atttttatta atatcggtag aggacaaatt gtatgtaaa
781 cagcattaat cgatgcacta gacaataaag aaatttttagc atgtggttta gatgtattag
841 caaatgaacc gattgatcat acacatccat taatgggacg tgataatggt ctgattacac
901 cacacattgg tagcgcatca gtaacaacac gggacaatat gattcaatta tgtattaata
961 atatagaagc gggtatgaca aatcagggtac cacatactcc agtaaaattga aaataagtat
1021 gggttttaaat cattggtaaa acaagcaaag caattgttaa atatgttatg cttgacttgc
1081 gaatgtatat atttgcgctg atgataattc aataacatta taaactcgtc atattaatgt
1141 gatgagttaa tttgattttg acgtatataa caaaattggt atatagactg taattgttta
1201 ttgttttaaat aacctttaaa atgaatgatg ttctcaacaa agtgtatcat ttacaataat
1261 tgagtgtatga caaccaatta ctatgttgaa tctataaaat taaaattgaa tttcattatg
1321 aatatcgata taatgaattg taaaaaacaa attttaaaac gtattttata ttgaacggtc
1381 ttttaaaagg cgtttttact aagaacttta agaggtgcaa tatgaaatct aaaagtaaac
1441 agccaccta taaatattgt gaagcattca aacctatttt attaacacta ttgtatttgg
1501 caatatttat tactttatat ttaatttatg gcagtggcga cacacacaat aacttcattt
1561 ataattgagtt ctaattgagg agacttaata tgacagatat tattaacaag ctgcaagcgt
1621 ttgcggtatgc aaatccacaa agcattgctg ttagacacac aactgatgaa ttaacttatc
1681 aacagttaat ggatgagtc agtaaaattag cacatcgatt acaaggtagt aagaaaccga
1741 tgattttatt cggtcacatg tcaccatata tgattgttgg gatgattggt gccattaaag
1801 caggatgtgg atatgtacct gtagacactt caattcctga agaccgtatt aaaatgatta
1861 ttaacaaggt tcaaccagag ttgtatttta atacgactga tgaatcattt gaaagtttag
1921 aaggcgaagt atttacaata gaagatatta aaacatctca agaccagta atttttgata
1981 gtcagattaa agataacgac acagtataca caatctttac atctggttct actggggaac
2041 ctaaaagggtg tcaaatgaa tatgcaagtt tagttcaatt tactgagtgg atgttagaac
2101 ttaataaatc aggaatgaa caacaatggc ttaaccaagc gccattttca ttgtatttat
2161 ctgtaatggc tatttatcca tgtttagcat caggcggtac attaaatctt gtagataaaa
2221 acatgattaa taaacctaaa ttattaaatg aaatgctaac agcaacaccg attaacattt
2281 gggtatcaac accatcattt atggaaatgt gtttattatt accaacgctt aatgaagaa
2341 aataggttag tcttaacgaa ttcttctctc gtgggtgaaat tctacctcac agagcagcaa
2401 aagcgttagt aaaccgtttc ccaagtgcga cgatttacaa cacatatggt ccaactgaag
2461 ctacggttagc agttacaagt attcaaatca cacaagaaat cttagatcaa tatccgacat
2521 tacctgttgg cgttgaaaaga ccaggcgcaa gattatctac tacagatgaa ggtgaacttg
2581 ttatcgaggg tcaaaagtga agtttaggat acttaaaaaa tgaccaaaaa acagctgaag
2641 tatttaattt cgatgacggt attcgtacat atcacactgg tgataaagcg aagtttgaaa
2701 atggccaatg gttcattcaa ggtcgtattg atttccaaat caaattgaat ggctacagaa
2761 tgggaattaga agaaattgaa acacaattac gccagtctga gttcgtaaaa gaagcgattg
2821 ttgtacctgt atataaaaat gataaagtta ttcatttaat tgggtgcaatt gtgccaacga
2881 ctgaagttac ggacaatgca gaaatgacta aaaatattaa aaatgacttg aaatcacgct
2941 taccagagta tatgattcct agaaagtgtg aatggatgga acaattgcca ttgacttcaa
3001 atggtaaaat tgacagaaag aaaattgcag aggttaattaa cggatgattc catatggtga
3061 ttttacattc ttcttaattg ctttaattgc attattacca gtcattatac ttggattttt
3121 aggtaaagcg agttacattt ataatggcgt agttacagca tttatgattg tgtaattctt
3181 ttcttctgat aaacataatc tgtttgacca aaagtattta agtgttcaat taattagttt
3241 tattatttac gtcgtatggc aagttttatt gataatgttt tattatcatt caaaaccaa
3301 aaataattca ttttcaaat ttgtaactgt aatggtttta tcaatattgc cattagcact
3361 tgtgaaagtg ttacaaagta catggttagg tggacatcag attcacttcc atgaaagtaa
3421 attaatgaa tttgttggtt tcttaggaat ttcttatggt acatttcaaaa gttgagctt
3481 aattatggaa attcgtgatg gttctatcaa agaaattaaa gtatggaaat taattcaatt
3541 tatttcattc ttccaacga ttcatctgg accaatcgat cgttacaac gtttcgttaa
3601 agacgataaa aaagtacca caggcaatga atatcgtgaa ttagtattaa aagcaattca
3661 catgattatg cttggtttct tgtataaata tattgttgc tactttatta acacatatgc
3721 aatcatgccg ttacaattag acttacatgg ctttgtcaat ttgtggttat atatgtacgc
3781 atacagctta tatttattct ttgactttgc aggttatagt ttatttgca tagcatttag
3841 ttattttattc ggtattaaaa caccaccaa cttcgataaa ctttcaag cgaaaaatat

```

Fig. 3

```

3901 taaagatttc tggaatagat ggcataatgac attatcattc tggttcagag attgtattta
3961 catgagatct ttattctaca tgtctcgtaa aaaattattg aagagtcaat ttgcaatgtc
4021 taacgtggca ttcttaataca acttcttcat aatgggaatt tggcatggta tcgaagtgtc
4081 ttacattggt tatggtttat accatgcagc attgtttata ggttatggct attatgaacg
4141 ttggcgtaag aaacatccgc cacgttggca aaatggtttc acaacagcac ttagcattgt
4201 gattacattc cactttgtaa catttggtct tttaatcttc tcaggtaaac ttatataata
4261 aaggagaatt taattatgga atttagagaa caagtattaa atttattagc agaagtagca
4321 gaaaatgata ttgtaaaaga aaatccagac gtagaaattt ttgaagaagg tattattgat
4381 tctttccaaa cagttggatt attattagag attcaaaaata aacttgatat cgaagtatct
4441 attatggact ttgatagaga tgagtgggca acaccaaata aaatcggtga agcattagaa
4501 gagttacgat gaaattaaaa ccttttttac ccattttaat tagtggagcg gtattcattg
4561 tctttctatt attacctgct agttggttta caggattagt aaatgaaaag actgtagaag
4621 ataatagaac ttcatgaca gatcaagtac taaaaggcac actcattcaa gataagttat
4681 acgaatcaaa caagtattat cctatatacg gctctagtga attaggtaaa gatgacccat
4741 ttaatcctgc aattgcatta aataagcata acgccaacaa aaaagcattc ttattaggtg
4801 ctggtggttc tacagactta attaacgcag ttgaacttgc atcacagtat gataaattaa
4861 aaggtaagaa attaacattt attatttcac cacaatggtt tacaaccat gggttaacga
4921 atcaaaactt tgatgctcgt atgtctcaaa ctcaaattaa tcaaagtgtc cagcagaaaa
4981 acatgtctac tgaattaaaa cgctggttat cacaacgttt attacagttt ccacatgtac
5041 acaataaaga atacttgaaa tcttatgcta aaaaccctaa agaaactaaa gatagttata
5101 tttctggttt taaagagaat caattgatta aaatagaagc gattaaatca ttggttgcaa
5161 tggataaatc tccattagaa catgttaaac ctgctacaaa accagacgct tcttgggatg
5221 agatgaaaca aaaagcagtt gaaattggta aagctgatac tacatcgaat aaatttggtc
5281 ttagagatca atactggaaa ttaattcaag aaagtaagcg taaagttaga cgtgactacg
5341 aattcaatgt taattctcca gaattccaag atttagaatt acttgtaaaa acaatgcgtg
5401 ctgctggtgc agatgttcaa tatgtaagta ttccatcaaa cgggtgatgg tatgaccaca
5461 ttggtatcga taaagaacgt cgtcaagcag tttataaaaa aatccattct actggttgtag
5521 ataattggtg taaaatttac gatatgactg ataaagatta tgaaaaatat gttatcagtg
5581 atgcogtaca catcggttgg aaagggttggg tttatatgga tgagcaaatt gcgaaacata
5641 tgaaagggtg accacaacct gaagtagata aacctaaaaa ttaaaatata aatagcacat
5701 aactcaacga ttttgattga gcgtatgtgc tatttttata ttttaaatct catagaatag
5761 aatagtaata tgtgcttgga tatgtggcaa taataaaata attaatcaga taaatagtat
5821 aaaataactt tcccatcagt ccaatttgac agcgaaaaaa gacaggtaat aactgattat
5881 aaataattca gtattcctgt

```

Fig. 3

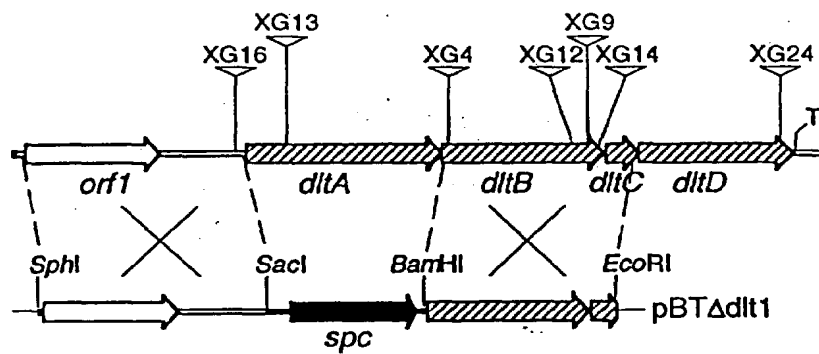


Fig. 4

***dltABCD*-Operon von *Staphylococcus xylosus* C2a**
(5300 bp)

Orf1: Ähnlichkeit zu Hydroxysäure-Dehydrogenasen (partielle Sequenz)
(Position 2-295)

I IGRGAVVDEEALVSALQNRQIAACGLDVLREPIDMAHPLLEMDNAVIVPHIGSASVTTRNRMIQLCVDNIRLVLNN
QPAKTPVNLK

DltA: D-Alanin-D-Alanyl-Carrierproteinligase
(Position 1136..2599)

MKDIYSLIENEKMYPEQIAIKHNTDVLTYRELNOYANKLADLIKDTKSPLIVYGHMSPFMI VGMIA SMKAGCGYVPL
DISMPEERINTIIEKINPDFIFNTSEHSLDSNGREIVNTETLLTDNRTVEFESKIKDQDIAYTIFTSGSTGEPKGVQI
RYESLNEFTNWMVDLNKIGENQQWLNQAPFSFDLSVMAIYPCLATAGTLNLVDKTMINKPKLLNDMLEQSKINVWVST
PSFEMCLMLPNLAETHYESLKEFFFCGEILPHKTAKMLLQRFPSAYIYNTYGPTEATVAVTSILITEAVINQYNPLP
VGKARPGTQLSLAENEELIISGQCVSEGYVKDEQRSNEVFKDIDKRKSYFTGDKATVQDDLWFITGRIDFQVKLNGYR
MELEEIEFHLRQIDVVKEAIVVPVYKNNKVTQLOGVVVLNDLNDKDEQTVIHDIKQELKOAMPEYMI PRKI I FKEQF
PLTINGKLDRKQIAEDVLA

DltB: Vermutliches Membranprotein; am D-Alanineinbau in Teichonsäuren beteiligt
(Position 2596-3810)

MIPYGTFTFFLIAFIVLIPVILGLTGKRSRIYNGISTAIMIVLIFSSDKHNLEFGQSYLSVQLINFALYLLWQVAIIM
FYWKSRSKNNSFIKFFTVALSILPLVVVKVMQSSWFGAAQLKLHENKVIEFIGFLGISYVTFKSVQLLMEIRDGSIK
EVKATKVFQFISFFPTISSGPIDRYKRFVKDESKIQSSESYRASLNKAHIFIMLGFLYKYIIAYLIQVYAINPLMLDF
SNFTAKCLYMYAYSILYFFDFAGYSLFAMAFSYLYGIQTPQNFQPFKAKNIKDFWNRWHMSLSFWFRDCIYMRALFF
MSKKRLLKNQFTMSNIAFSLNFLIMGIWHGIEVHYILYGLYHAVLFIGYGYEYKWRKNHPPRWSNQYTTMLSIIVTFH
FVTFGFLIFSGKLF

DltC: D-Alanin-Carrierprotein
(Position 3828-4062)

MEFREQVLDLLTEVAENNVIKENPOVELFEEGIFDSFQTVGLLLEIQNKLDIEVSIMDFDRDEWATPNKIVEVLEELR

DltD: Vermutliches Exoprotein; am D-Alanineinbau in Teichonsäuren beteiligt
(Position 4061-5209)

MKLKPFPIPIVSLVLFGI FLVLPASWFAGLINSKTVATQSVALTDOVLKGTLVQDKMYQSDAYYPIYGSSELEKDDPF
NPAILLNNRNQVSKKPLIGTGGSTDLVNAVELGSQYGNLKGKKMAFIVSPQWFTKNGLTQDNFKARISKAQLNQLFK
QEQLSPCLKORYAKRLLQFKDVENRVYLEKVAQGKLQENKNYLSNFKDEQLKKIEAIKAVYPLRKSPVSHIDPITSKN
DSWDDVMTKAEIYGAKHTKTNEFGIRDEYWDLIKHKRKRINRNHEFRENSPEFKDLELLVDTLRERGADVYIIIPSN
GKWYDHIGIDKDRRQKIYKKIDKTIIVDHGGQTYDMSDKDYEYVVS DAVHIGWKGVYITKNIDEHMHQK

Fig. 5

***dltABCD*-Operon von *Staphylococcus aureus* SA113**
(5900 bp)

Orf1: Ähnlichkeit zu Hydroxysäure-Dehydrogenasen
(Position 51-1010)

MVKIVVSRKIPDKFYQQLSKLGDVVMWQKSLVPMKQFVTALRDADACFITLSEQIDAEILAQSPNLKVIANMAVGY
DNIDVESATANNVVVTNTPNVLTTETTAELGFTLMLAIARRIVEAEKYVEADAWQSWGYPYLLSGKDVFNSTIGIYGMGD
IGKAFARRLQGFNTNILYHNRSRHKDAEADFNATYVSFETLLAESDFIICTAPLTKETHHKFNAAEAFEQMKNDIAFIN
IGRGQIVDETALIDALDNKEILACGLDVLANEPIDHTHPLMGRDNVLITPHIGSASVTTRDNMIQLCINNIEAVMTNQ
VPHTPVN

DltA: D-Alanin-D-Alanyl-Carrierproteinligase
(Position 1590..3047)

MTDIINKLQAFADANPQSIIVRHTTDELTYQQLMDESSKLAHRLQGSKKPMILFGHMSPYMIVGMIGAIAKAGCGYVPV
DTSIPEDRIKMIINKVQPEFVNTTDESFESELEGEVFTIEDIKTSQDPVIFDSQIKDNDTVYTIFTSGSTGEPKGVQI
EYASLVQFTEWMLELNKSGNEQQWLNQAPFSFDLSVMAIYPCLASGGTLNLVDKNMINKPKLLNEMLTATPINIWVST
PSFMEMCLLLPTLNEEQYGSLSNEFFFCGEILPHRAAKALVNRFP SATIYNTYGPTEATVAVTSIQITQEI LDQYPTLP
VGVEREPGARLSTTDEGELVIEGQSVSLGYLKNQKTAEVFNFDGIRTYHTGDKAKFENGQWFIQGRIDFQIKLNGYR
MELEEIETQLRQSEFVKEAIVVPVYKNDKVIHLIGAIVPTTEVTDNAEMTKNIKNDLKS
LPEYMI PRKF EWMEQLPLTSNGKIDRKKIAEVING

DltB: Vermutliches Membranprotein; am D-Alanineinbau in Teichonsäuren beteiligt
(Position 3044-4258)

MIPYGDFTFFLIALIALLPVILGLFLGKRSYIYNGVVTAFMIVLIFSSDKHNLFDQKYSVQLISFIIYVWQVLLIM
FYYHSPKPNNSFSKFVTVMVLSILPLALVKVLQSTWLGGHQIHFEHESKLIEFVGFLGISYVTFKSVQLIMEIRDGSIK
EIKVWKLIOFISFFPTISSGPI DRYKRFVKDDKKVPTGNEYRELVLKAIHMIMLGFLYKYIVAYFINTYAIMPLQLDL
HGFVNWLWLYMYAYSLSYLFDFAGYSLFAIAFSYLFGIKTPPNFDKPFKAKNIKDFWNRWHMTLSFWFRDCIYMRSLFY
MSRKKLLKSQFAMSNVAFILNFFIMGIWHGIEVYIYVGLYHAALFIGYGYERWRKKHPPRWQNGFTTALSIVITFH
FVTFGLIFSGKLI

DltC: D-Alanin-Carrierprotein
(Position 4276-4512)

MEFREQVLNLLAEVAENDIVKENPDVEIFEEGIIDSFQTVGLLLEIQNKLDIEVSIMDFDRDEWATPNKIVEALEELR

DltD: Vermutliches Exoprotein; am D-Alanineinbau in Teichonsäuren beteiligt
(Position 4509-5684)

MKLKPFPLPILISGAVFIVFLLLPASWFTGLVNEKTVEDNRTSLTDQVLKGTLIQDKLYESNKYYPIYGSSELGKDDPF
NPAIALNKHANANKAFLLGAGGSTDLINAVELASQYDKLKGKLTFTIISPQWFTNHGLTNQNF D ARMSQTQINQMFQQ
KNMSTELKRRYAQRLLQFPHVHNKEYLKS YAKNPKETKDSYISGFKENQLIKIEAIKSLFAMDKSPLEHVKPKATKPD
SWDEMKQKAVEIGKADTTSNKFGIRDQYWKLIQESKRKVRDYE FNVNSPEFQDLELLVKTMRAGADVQYVSI PSNG
VWYDHIGIDKERRQAVYKKIHSTVVDNGGKIYDMTDKDYEKYVISDAVHIGWKGWVYMDEQIAHKMGEPQPEVDKPK
N

Fig. 6

Stamm	Molares Verhältnis von D-Alanin und Phosphat in	
	Lipoteichonsäuren (LTA)	Wandteichonsäuren (WTA)
<i>S. aureus</i> Sa113		
Wildtyp	75	51
Wildtyp (pRBdlt1)	82	69
<i>dltA::spc</i> (AG1)	0	0
<i>dltA::spc</i> (AG1) (pRBdlt1)	78	67
<i>S. xylosus</i> C2a		
Wildtyp	95	15
Wildtyp (pRBdlt1)	100	20
<i>dltA::Tn917</i> (XG13)	0	0
<i>dltB::Tn917</i> (XG4)	0	0
<i>dltD::Tn917</i> (XG24)	0	0
<i>dltA::Tn917</i> (XG13) (pRBdlt1)	96	15

Fig. 7

Peptid (Herkunft)	Peptid- Netto- ladung	Minimale Hemmkonzentration (µg/ml) gegen			
		Wildtyp	<i>dlt</i> -Mutante	Wildtyp (pRBdlt1)	<i>dlt</i> -Mutante (pRBdlt1)
<i>Staphylococcus aureus</i> Sa113:					
Defensin (humane Neutrophile)	+3	>100	10	>100	Nb
Protegrin 3 (porcine Leukozyten)	+6	13	0,76	17,2	Nb
Protegrin 5 (porcine Leukozyten)	+6	20	0,86	19	Nb
Tachyplesin 1 (Pfeilschwanzkrebs)	+7	11	1,0	Nb	Nb
Tachyplesin 3 (Pfeilschwanzkrebs)	+7	8,6	1,2	Nb	Nb
Magainin II ^a (Krallenfroschhaut)	+4	45	3,8	46	Nb
Gallidermin (<i>Staphylococcus gallinarum</i>)	+3	3,4	0,41	4,6	3,3
Nisin (<i>Lactococcus lactis</i>)	+3	22	0,45	35	19
Gramicidin D (<i>Bacillus brevis</i>)	0	1,2	0,85	1,4	Nb
Polylysin ^b	positiv	>100	>100	Nb	Nb
<i>Staphylococcus xylosus</i> C2a:					
Magainin II ^a (Krallenfroschhaut)	+4	45	4,3	Nb	Nb
Gallidermin (<i>Staphylococcus gallinarum</i>)	+3	3,3	0,23	3,8	4,2
Nisin (<i>Lactococcus lactis</i>)	+3	23	2,6	23	20
Gramicidin D (<i>Bacillus brevis</i>)	0	2,3	2,1	2,7	Nb
Polylysin ^b	positiv	>100	>100	Nb	Nb

^a Es wurde die synthetische Peptidvariante (A^{8,13,18})-Magainin II-Amid mit höherer antimikrobieller Aktivität verwendet.

^b Es wurde Polylysin mit einem ungefähren Molekulargewicht von 3,97 kDa verwendet.
Nb, nicht bestimmt.

Fig. 8

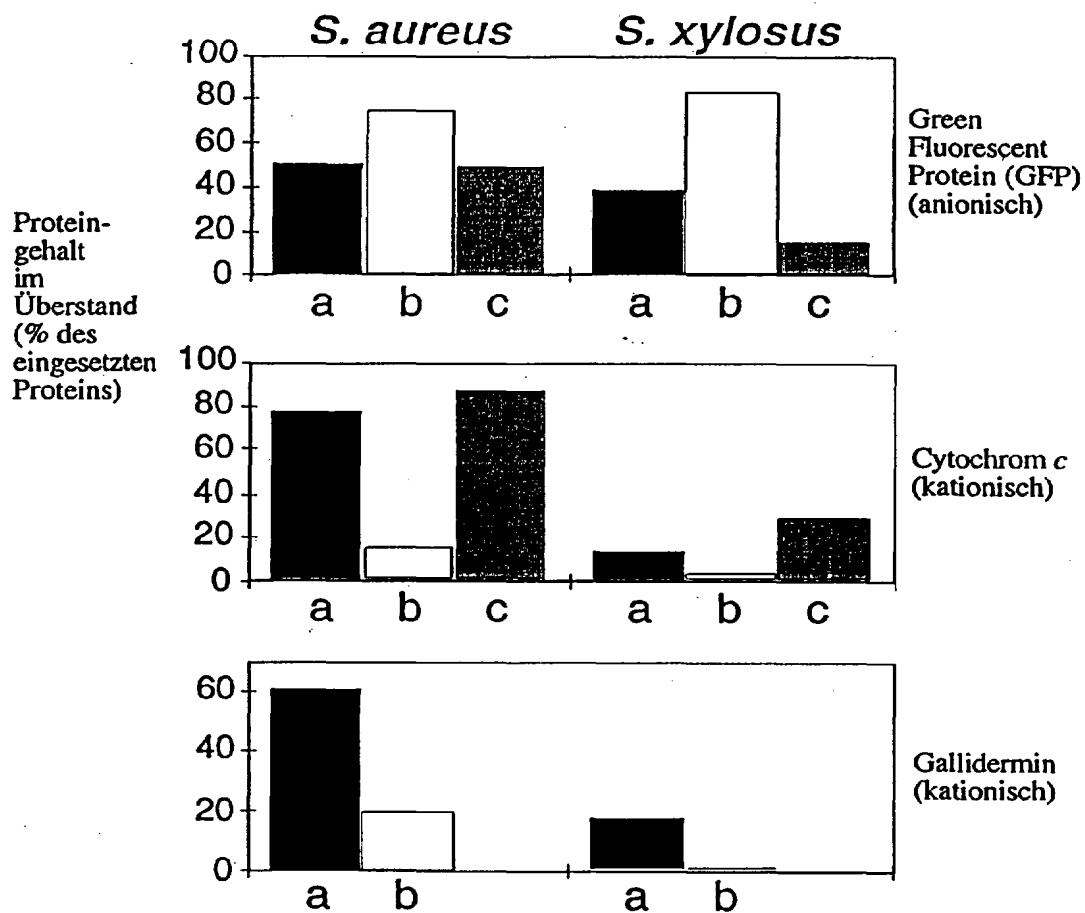


Fig. 9